

ADSORBENT MATERIAL FOR LOW DENSITY LIPOPROTEIN AND FIBRINOGEN, ADSORPTION REMOVING METHOD AND ADSORBER FOR THE SAME

Publication number: JP2004129975

Publication date: 2004-04-30

Inventor: NAKATANI MASARU; KOBAYASHI AKIRA;
OGINO EIJI; FURUYOSHI SHIGEO

Applicant: KANEGAFUCHI CHEMICAL IND

Classification:

- international: *A61M1/36; B01D15/00; B01J20/24; B01J20/26;*
A61M1/36; B01D15/00; B01J20/22; (IPC1-7):
A61M1/36; B01D15/00; B01J20/24; B01J20/26

- European:

Application number: JP20020299883 20021015

Priority number(s): JP20020299883 20021015

Report a data error here

Abstract of **JP2004129975**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an adsorbent material for efficiently adsorbing low density lipoproteins and fibrinogen without losing useful substances such as albumin and HDL (a high density lipoprotein) as much as possible and obtaining body fluid reduced in the concentrations of the above materials.

SOLUTION: The adsorbent material is formed by immobilizing aniline and a polyanionic compound on a water-insoluble porous carrier. The adsorbent material having a mol ratio of the quantity of aniline immobilized to the quantity of the polyanionic compound immobilized ranging from 3 to 1000 can efficiently adsorb the low density lipoproteins and fibrinogen in the body fluid.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-129975

(P2004-129975A)

(43) 公開日 平成16年4月30日(2004.4.30)

(51) Int. Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 M 1/36

A 6 1 M 1/36 5 4 3

4 C 0 7 7

B 0 1 D 15/00

A 6 1 M 1/36 5 4 5

4 D 0 1 7

B 0 1 J 20/24

B 0 1 D 15/00 K

4 G 0 6 6

B 0 1 J 20/26

B 0 1 J 20/24 C

B 0 1 J 20/26 H

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号

特願2002-299883 (P2002-299883)

(22) 出願日

平成14年10月15日 (2002.10.15)

(71) 出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(72) 発明者 中谷 勝

大阪府摂津市島飼西5-1-1

(72) 発明者 小林 明

大阪府摂津市島飼西5-1-1

(72) 発明者 荻野 英司

大阪府摂津市島飼西5-1-1

(72) 発明者 古吉 重雄

大阪府摂津市島飼西5-1-1

Fターム (参考) 4C077 AA30 BB03 KK13 MM07 NN02

NN03 PP02 PP18

4D017 AA11 BA07 CA12 CA13 CA14

CB01

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンの吸着材、吸着除去方法及びその吸着器

(57) 【要約】

【課題】 アルブミンやHDLなどの有用物質を極力損失せず、低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンを効率よく吸着し、これらの濃度を低減させた体液を得るための吸着材を提供する。

【解決手段】 水不溶性多孔質担体にアニリンおよびポリアニオン性化合物を固定化してなる吸着材であって、アニリンの固定化量とポリアニオン性化合物の固定化量のモル比が3～1000である吸着材が、体液中の低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンを効率よく吸着できる。

【選択図】 無し

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

水不溶性多孔質担体にアニリンおよびポリアニオン性化合物を固定化してなる吸着材であって、アニリン固定化量とポリアニオン性化合物固定化量とのモル比が 3 以上 1000 以下である体液中の低密度リポ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着材。

【請求項 2】

ポリアニオン性化合物がデキストラン硫酸である請求項 1 記載の体液中の低密度リポ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着材。

【請求項 3】

水不溶性多孔質担体がセルロース担体である請求項 1 または 2 記載の体液中の低密度リポ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着材。

10

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれかに記載の低密度リポ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着材を、低密度リポ蛋白およびフィブリンノーゲンを含有する体液と接触させることを特徴とする低密度リポ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着除去方法。

【請求項 5】

液の入口および出口を有し、かつ吸着材の容器外への流出防止手段を備えた容器内に、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の低密度リポ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着材を充填してなることを特徴とする、体液中の低密度リポ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着器。

【発明の詳細な説明】

20

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、体液中に存在する低密度リポ蛋白およびフィブリンノーゲンを吸着し、これらの濃度を低減させた体液を得るための吸着材、ならびにこの吸着材を利用した体液中の低密度リポ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着除去方法、およびこの吸着材を利用した体液中の低密度リポ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着器に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、食生活の欧米化や高齢化に伴い動脈硬化症を発症する患者が増加している。低密度リポ蛋白（LDL）や極低密度リポ蛋白（VLDL）はコレステロールを多く含み、動脈硬化の原因となることはよく知られており、高脂血症や高コレステロール血症を有する患者に動脈硬化症の発症率が高いこともまた事実である。一方、高密度リポ蛋白（HDL）は動脈硬化の遅延因子であることが知られている。

30

【0003】

これらの疾患の治療法としては、食事療法、薬物療法が行われているが、効果が不十分な患者には、血液を体外に導き、血液中から低密度リポ蛋白を吸着除去する治療法が適用される。なかでもデキストラン硫酸固定化セルロースビーズを吸着材とする低密度リポ蛋白吸着の除去療法が広く普及し、治療効果をあげている。

【0004】

一方、フィブリンノーゲンの濃度と冠動脈疾患や脳卒中の発症頻度は相関すると報告されており（非特許文献 1 を参照）、動脈硬化症に関連するこれらの疾患の発症を防止するためには、低密度リポ蛋白だけでなく、フィブリンノーゲンの濃度を低下させることが望まれている。

40

【0005】

また、動脈硬化症のなかでも、末梢血管の閉塞をきたす疾患は閉塞性動脈硬化症と呼ばれる。該疾患では末梢の血管が狭小化、閉塞により末梢の血液循環状態が悪くなり、手足の冷感、しびれ感、間欠性跛行、安静時痛、潰瘍、壊疽などの症状が出現し、ひどい場合は四肢切断に至る。このような末梢血管病変を有する閉塞性動脈硬化症においては、フィブリンノーゲンの濃度が健常人に比べ高値であると報告されており（非特許文献 2 を参照）、閉塞性動脈硬化症の治療においても低密度リポ蛋白だけでなく、フィブリンノーゲンの濃度を

50

低下させることが望まれている。

【0006】

このように、動脈硬化症、なかでも閉塞性動脈硬化症の患者血液中の低密度リボ蛋白、ならびにフィブリンノーゲンの濃度を低下させる治療法が望まれているなかで、先述のデキストラン硫酸固定化セルローズビーズを吸着材とする低密度リボ蛋白の吸着除去療法は、低密度リボ蛋白の吸着は優れているが、フィブリンノーゲンの低下は十分なものではない。また、二重過血分離交換法が適用されることがある。確かにこの方法では低密度リボ蛋白、ならびにフィブリンノーゲンが除去されるが、補液が必要であること、除去される物質の選択性が小さく、低密度リボ蛋白やフィブリンノーゲン以外の有用な物質が除去されてしまうなどの問題点がある。またヘパリン沈殿法という治療法が開発され、低密度リボ蛋白、ならびにフィブリンノーゲンが除去されると報告されているが、操作方法が煩雑であるため、一般的治療法として普及するには至っていない。

10

【0007】

一方、疎水性構造と陰性官能基とを有する化合物を表面に有する架橋多孔質材からなる吸着材を用い、フィブリンノーゲンと低密度リボ蛋白質とを除去することできることが知られている（特許文献1を参照）。しかしながら該吸着材のフィブリンノーゲン吸着能は確かに優れているが、低密度リボ蛋白吸着能は十分なものではない。このような吸着材を使用し臨床に十分と考えられる吸着性能を発揮するには大量の吸着体を使用する必要があることから、治療中に体外に持ち出される血液が増加し、これに伴い治療中に血圧低下が発生する可能性が高まることになる。

20

【0008】

以上のように、従来の技術では他の有用な物質を損失することなく、簡便な操作で低密度リボ蛋白およびフィブリンノーゲンをともに効率よく除去する方法が存在せず、該方法の開発が望まれていた。

【0009】

【特許文献1】特開平7-136256

【非特許文献1】W. B. Kannel等、The Journal of the American Medical Association、第258巻、1183～1186頁、1987年

【非特許文献2】P. Poredos等、Angiology、第47巻3号、258～259頁、1996年

30

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記課題に対して、アルブミンやHDLなどの有用物質を極力損失せず、低密度リボ蛋白およびフィブリンノーゲンを効率よく吸着し、これらの濃度を低減させた体液を得るための吸着材、ならびにこの吸着材を利用した体液中の低密度リボ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着除去方法、およびこの吸着材を利用した体液中の低密度リボ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着器を提供するものである。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、アルブミンやHDLなどの有用物質を極力損失せず、低密度リボ蛋白およびフィブリンノーゲンを効率よく吸着除去できる吸着体について鋭意研究を行った。その結果、水不溶性多孔質担体にアニリンおよびポリアニオン性化合物を固定化してなる吸着材であって、アニリンの固定化量とポリアニオン性化合物の固定化量のモル比が特定の範囲である吸着材が、体液中の低密度リボ蛋白およびフィブリンノーゲンを効率よく吸着できることを見出し、本発明の完成に至った。

40

【0012】

即ち、本発明の第1発明は、水不溶性多孔質担体にアニリンおよびポリアニオン性化合物を固定化してなる吸着材であって、アニリン固定化量とポリアニオン性化合物固定化量のモル比が8以上1000以下である体液中の低密度リボ蛋白およびフィブリンノーゲンの

50

吸着材に関する。第2発明は、前記吸着材を低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンを含有する体液と接触させることを特徴とする低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンの吸着除去方法に関する。第3発明は液の入口および出口を有し、かつ吸着材の容器外への流出防止手段を備えた容器内に、請求項1から3のいずれかに記載の低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンの吸着材を充填してなることを特徴とする、体液中の低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンの吸着器に関する。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明における体液とは、血液、または血漿を指す。

本発明におけるポリアニオン性化合物とは、分子内に複数のアニオン性官能基を有する化合物をいう。本発明におけるアニオン性官能基とは、カルボキシル基、スルホン酸基、硫酸エステル基、リン酸エステル基など、pHが中性で負に帯電する官能基をいう。このうち、吸着能力の点でカルボキシル基、スルホン酸基、硫酸エステル基が好ましく、中でも吸着能力が優れている点で特に硫酸エステル基が好ましい。

【0014】

このようなポリアニオン性化合物の代表例としては、ポリアクリル酸、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリメタクリル酸、ポリリン酸、スチレン-マレイン酸共重合体などの合成ポリアニオン性化合物、デキストラン硫酸、カルボキシメチルセルロースなどの合成酸性多糖類、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ケタラン硫酸などの硫酸エステル基を有する生体由来の酸性ムコ多糖類、ヘパリン、ヘパラン硫酸などのN-スルホン酸基および硫酸エステル基を有する酸性ムコ多糖類、コンドロイチン、ホスホマンナンなどの生体由来のアニオン性官能基を有する多糖類、ならびにデオキシリボ核酸、リボ核酸などの生体由来の核酸などがあげられるが、これらの代表例に限定されるわけではない。

【0015】

これらに代表される化合物のなかでも、安価に純度の高い物質がえられる、さらにはアニオン性官能基の導入量をコントロールできるなどの理由から、生体由来の化合物をそのまま用いるよりも、合成化合物を用いるほうがより実用的である。これらの点より、ポリアクリル酸、ポリビニル硫酸、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、ポリメタクリル酸、ポリリン酸、スチレン-マレイン酸共重合体などの合成ポリアニオン性化合物や、デキストラン硫酸、カルボキシメチルセルロースなどの合成酸性多糖類が好ましく用いられる。

【0016】

ポリアニオン性化合物の分子量は1000以上、とくに3000以上であることが、低密度リボ蛋白への親和性やアニリンとの組み合わせによるフィブリノーゲン吸着性能の面で好ましく用いられる。ポリアニオン性化合物の分子量の上限はとくに制限はないが、実用上の面から100万以下が好ましい。

【0017】

本発明において、水不溶性多孔質担体にポリアニオン性化合物を固定化する方法は種々あり、いかなる方法でもよいが、代表的な方法としては、(1)ポリアニオン性化合物を、化学的にあるいは放射線や電子線を用いたグラフト法によって水不溶性多孔質担体表面に共有結合する方法、(2)水不溶性多孔質担体の官能基を介して化学的方法によりポリアニオン性化合物を共有結合する方法などがある。

【0018】

このなかでも、本発明の吸着材がポリアニオン性化合物とアニリンとを固定化してなる吸着材であることを考慮し、官能基を介して化学的にポリアニオン性化合物を共有結合させる方法が、アニリンの固定化が同じ方法でおこなえるため、本発明においてはより簡便で好ましい方法といえる。

【0019】

本発明におけるアニリンの固定化方法は、水不溶性多孔質担体の官能基を介して化学的方

10

20

30

40

50

法によりポリアニオン性化合物を共有結合する方法が好ましく用いられる。

【0020】

本発明におけるアニリン固定化量とポリアニオン性化合物固定化量モル比（AN/PA比）とは、下式により算出される値をいう。

AN/PA比＝担体量（ml）当たりのアニリン固定化モル数/担体量（ml）当たりのポリアニオン固定化モル数

AN/PA比を8以上に制御することにより、アニリン単独あるいはポリアニオン単独を固定化した場合に比べ、LDL-コレステロールおよびフィブリノーゲンの低下率が上昇することを見いだした。AN/PA比が8よりも小さい場合、フィブリノーゲンの低下の割合がアニリンのみを固定化した場合と同程度となり、アニリンとポリアニオン性化合物とをAN/PA比8以上1000以下で固定化したときの明確な効果がみられなくなる。AN/PA比の上限は、ポリアニオン性化合物が少しでも固定化されていれば、アニリン単独を固定化した場合に比べてLDL-コレステロールおよびフィブリノーゲンの低下率が上昇すると考えられるため特に制限はないが、AN/PA比があまりに大きくなると、LDL-コレステロールおよびフィブリノーゲンの低下の割合がアニリン単独を固定化した場合に徐々に近づくことになり、アニリンとポリアニオン性化合物とを固定化する効果が落ちる。以上より、好ましいAN/PA比の範囲は8以上1000以下であり、吸着性能発揮の観点からより好ましくは8.5以上500以下、最も好ましくは6以上100以下である。

10

【0021】

本発明におけるポリアニオン性化合物の固定化量は、実施例1において具体的方法を示す通り、該ポリアニオン性化合物がトルイジンブルーを吸着する性質を利用した方法により、その固定化量を測定する。

20

【0022】

本発明におけるアニリンの固定化量は、実施例1において具体的方法を示す通り、ジフェニルピクリルヒドラジルを用いたアミンの定量により測定する。

【0023】

本発明における水不溶性多孔質担体は、常温常圧で固体であり水不溶性であり、かつ適当な大きさの細孔を有する、すなわち多孔構造を有する。水不溶性多孔質担体の形状としては、球状、粒状、平膜状、繊維状、中空系状等いずれも有効に用いられるが、実用時の体液の流通面より球状または粒状がより好ましく用いられる。

30

【0024】

水不溶性多孔質担体が球状または粒状であるはあい、平均粒径は10μmから1000μmであることが好ましく、吸着効率の点からさらに好ましくは25～1000μm、最も好ましくは50～600μmである。

【0025】

水不溶性多孔質担体の球状蛋白質の排除限界分子量は 5×10^5 以上のものが好ましく用いられる。排除限界分子量とは、成書（サイズ排除クロマトグラフィー、森定雄著、共立出版）に述べられているとおり、サイズ排除クロマトグラフィーにおいて種々の分子量を有する試料を流した際に、細孔内に侵入できない（排除される）分子の内最も小さい分子量をもつものの分子量をいう。球状蛋白質の排除限界分子量が 5×10^5 を下回るとフィブリノーゲンおよび低密度リボ蛋白の吸着能力が小さく、実用に耐えない。また球状蛋白質の排除限界分子量が 1×10^8 を超えると、ポアサイズが大きくなりすぎ、吸着に寄与する表面積が低下する結果、フィブリノーゲンおよび低密度リボ蛋白の吸着能力が低下する。以上より、本発明における水不溶性多孔質担体の球状蛋白質の排除限界分子量は 5×10^5 以上、 1×10^8 以下のものが好ましく、吸着性能発揮の観点からより好ましくは 1×10^6 以上、 1×10^8 以下、さらに好ましくは 2×10^6 以上、 1×10^8 以下である。

40

【0026】

本発明における水不溶性多孔質担体は、ポリアニオン性化合物、およびアニリンを固定化

50

するために、結合に利用しうる官能基を有することが好ましい。このような官能基の代表例としては、アミノ基、アミド基、カルボキシル基、酸無水物基、スクシンイミド基、水酸基、チオール基、アルデヒド基、ハロゲン基、エポキシ基、シラノール基、トレシル基などがあげられるが、これらに限定されるわけではない。また、水不溶性多孔質担体は、たとえばハロゲン化シアン化法、エピクロロヒドリン法、ビスエポキシド法、プロモアセチルプロミド法などの方法で活性化されていてもよく、このなかで実用上、安全上の観点から、エピクロロヒドリン法がよく好ましく用いられる。

【0027】

本発明の水不溶性多孔質担体の強度としては、あまり柔らかいもの、容易に壊れるものは好ましくない。体液を流した場合に、圧密化が生じると十分な体液流量が得られなくなり処置時間の延長さらに処置続行不可能となりうるので、吸着材の圧密を防ぐためには、吸着材は十分な機械的強度を有するもの（硬質）であることが好ましい。ここでいう硬質とは、後記参考例に示すごとく、吸着材を円筒状カラムに均一に充填し、水性液体を流した際の圧力損失と流量の関係が、少なくとも 0.3 kgf/cm^2 まで直線関係にあるものをいう。

【0028】

本発明における水不溶性多孔質担体の材質は特に限定されないが、セルロース、酢酸セルロース、デキストリンなどの多糖類からなる有機担体、ポリスチレン、ステレンージビニルベンゼン共重合体、ポリアクリルアミド、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリアクリル酸エステル、ポリメタクリル酸エステル、ポリビニルアルコールなどの合成高分子などが代表例として挙げられる。これらは、ヒドロキシエチルメタクリレート等のヒドロキシ基を有する高分子材料やポリエチレンオキサイド鎖を有する単量体と他の重合性単量体との共重合のようなグラフト共重合体等のコーティング層を有していてもよい。これらの中でセルロースや、ポリビニルアルコール等からなる合成高分子が、担体表面に活性基を導入しやすいため、実用上好ましく用いられる。

【0029】

なかでもセルロースからなる担体が最も好ましく用いられる。セルロースからなる担体は、（１）機械的強度が比較的高く、強であるため破壊されたり微粒子を生じたりすることが少なく、カラムに充填した場合に血液を高流速で流しても圧密化しにくいため高流速で体液を流すことが可能となる、（２）安全性が合成高分子担体に比べて高いなどの優れた点を有しており、本発明における水不溶性多孔質担体として最も好適に用いることができる。

【0030】

本発明の吸着器を用いた体外循環治療の抗凝固剤としては、ヘパリン、低分子量ヘパリン、メシル酸ナフモスタット、メシル酸ガベキサート、アルガトロバン、アジッド・シトレート・デキストロース液（ＡＣＤ液）やシトレート・フォスフェート・デキストロース液（ＣＰＤ液）などのクエン酸含有抗凝固剤などいずれを用いてもよい。なかでもヘパリンは一般的に最も好ましく用いられる抗凝固剤としてあげることができる。

【0031】

本発明の吸着材を用いて、体液から低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンを吸着除去する方法には種々ある。代表的な方法としては、体液を取り出してバッグなどに貯留し、これに吸着材を混合して低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンを除去した後、吸着材を別して低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンが除去された体液を得る方法：体液の流入口および流出口を有し、体液は通過するが吸着材は通過しないフィルターを流出口に装着した容器へ吸着材を充填し、これに体液を流す方法などがある。いずれの方法を用いても良いが、後者の方法は操作も簡単であり、また体外循環回路に組み込むことにより、患者の体液から効率よくオンラインで低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンを除去することが可能であり、本発明の吸着材を用いた低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンの吸着除去方法として最も好ましい。

【0032】

10

20

30

40

50

つぎに、本発明の吸着器を、一実施例の概略断面図である図1にもとづき説明する。

【0033】

図1中、1は体液の流入口、2は体液の流出口、3は低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンの吸着材、4および5はメッシュ、6はカラム、7は低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンの吸着器である。しかしながら本発明における低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンの吸着器はこのような具体例に限定されるものではなく、液の入口および出口を有し、かつ吸着材の容器外への流出を防止する手段を備えた容器内に、低密度リボ蛋白およびフィブリノーゲンの吸着材を充填したものであれば、形状は特に限定されない。

【0034】

【実施例】

以下、本発明の方法を実施例に基づいて具体的に説明する。

【0035】

(参考例)

両端に孔径15 μ mのフィルターを装着したガラス製円筒カラム(内径9mm、カラム長150mm)にアガロース材料(バイオラッド(Bio-Rad)社製のBioGel A-5m、粒径50~100メッシュ)、ビニル系高分子材料(東ソー(株)製のトヨパールHW-65、粒径50~100 μ m)およびセルロース材料(チッソ(株)製のセルロファインGC-700m、粒径45~105 μ m)をそれぞれ均一に充填し、ペリスタティックポンプにより水を流し、流量と圧力損失 ΔP との関係を求めた。その結果を図2に示す。

【0036】

図2に示すごとく、トヨパールHW-65およびセルロファインGC-700mが圧力の増加にほぼ比例して流量が増加するのに対し、BioGel A-5mは圧密化を引き起こし、圧力を増加させても流量が増加しないことがわかる。本発明においては前者のごとく、圧力損失 ΔP と流量の関係が0.8k θ /cm²までの直線関係にあるものを硬質という。

【0037】

(実施例1)

平均粒径約260 μ m、球状蛋白質の排除限界分子量が 5×10^7 の多孔質セルロースビーズ550mlに水230ml、2N NaOH水溶液220mlおよびエビクロロヒドリン75mlを加え、40℃で2時間して反応させた。反応後ビーズを水で十分洗浄してエポキシ化セルロースビーズを得た。エポキシ化セルロースビーズのエポキシ基量は15.8 μ mol/ml(湿潤体積)であった。

【0038】

デキストラン硫酸(硫黄含量約18%、分子量約4000)210 θ を300mlの水に溶解したデキストラン硫酸水溶液を調製し、エポキシ化セルロースビーズ450mlおよび水40mlを加え、NaOH水溶液でアルカリ性とした後、45℃で2時間反応させた。反応後、ビーズを水および食塩水で十分洗浄した後、水を加えて全体を900mlとし、これにアニリン2.5mlを加え、65℃で6時間反応させた。その後、ビーズを水および食塩水で十分洗浄してデキストラン硫酸およびアニリン固定化セルロースビーズ(A)を得た。

【0039】

このAを0.4mlはかり取り、これにヘパリン加健康人血2.4mlを加え、37℃で2時間振し、上澄み血中のLDL-コレステロール、フィブリノーゲン、HDL-コレステロール、およびアルブミン濃度を測定した。その結果、LDL-コレステロールが79m θ /dlから17m θ /dlに、フィブリノーゲンが165m θ /dlから96m θ /dlに低下したが、HDL-コレステロールは101m θ /dlから89m θ /dlへ、アルブミンは4.5 θ /dlから4.2 θ /dlへ低下するに留まった。

【0040】

なお、Aのアニリン固定化量は、ジフェニルピクリルヒドラジルがアミノ基の水素原子を

10

20

30

40

50

引き抜き、ジフェニルピクリルヒドラジンに変化することを利用して測定した。すなわち 1 ml の A をメタノールで置換した後、1 mmol/l の酢酸緩衝液 (pH 約 2.5) を 1 ml、および約 1.6 mg/l に調整したジフェニルピクリルヒドラジン (東京化成) のメタノール溶液を 4 ml 加え、60℃で 1 時間静置した後、上清のジフェニルピクリルヒドラジンを 515 nm における吸光度により定量し、その減少量から求めた (検量線の作成にはアニリノエタノール (アルドリッチ) を使用した)。その結果、A のアニリン固定化量は 2.76 $\mu\text{mol/l}$ であった。

【0041】

また、A のデキストラン硫酸固定化量は、デキストラン硫酸とトルイジンブルーが親和性を有することを利用して測定した、すなわち 1 ml の A に対し、約 90 mg/l に調整したペーシック・ブルー 17 (東京化成) 水溶液を 100 ml 程度加え、10 分間、静置後、上清のペーシック・ブルーを 630 nm における吸光度により定量し、その減少量から求めた。その結果、A のデキストラン硫酸固定化量は 0.20 $\mu\text{mol/l}$ であり、AN/PA 比は 13.8 であった。

【0042】

(実施例 2)

デキストラン硫酸の反応時間を 2 時間から 4 時間にかえたほかは実施例 1 と同様にしてデキストラン硫酸およびアニリン固定化セルロースビーズ (B) を得た。この B のアニリン固定化量は 2.46 $\mu\text{mol/l}$ 、デキストラン硫酸固定化量は 0.40 $\mu\text{mol/l}$ 、AN/PA 比は 6.2 であった。

この B の吸着性能を実施例 1 と同様にして求めた。その結果、LDL-コレステロールが 79 mg/dl から 17 mg/dl に、フィブリノーゲンが 165 mg/dl から 96 mg/dl に低下したが、HDL-コレステロールは 101 mg/dl から 90 mg/dl へ、アルブミンは 4.5 g/dl から 4.2 g/dl へ低下するに留まった。

【0043】

(実施例 3)

デキストラン硫酸の反応時間を 2 時間から 8 時間にかえたほかは実施例 1 と同様にしてデキストラン硫酸およびアニリン固定化セルロースビーズ (C) を得た。この C のアニリン固定化量は 2.28 $\mu\text{mol/l}$ 、デキストラン硫酸固定化量は 0.60 $\mu\text{mol/l}$ 、AN/PA 比は 3.8 であった。

この C の吸着性能を実施例 1 と同様にして求めた。その結果、LDL-コレステロールが 79 mg/dl から 19 mg/dl に、フィブリノーゲンが 165 mg/dl から 119 mg/dl に低下したが、HDL-コレステロールは 101 mg/dl から 90 mg/dl へ、アルブミンは 4.5 g/dl から 4.2 g/dl へ低下するに留まった。

【0044】

(実施例 4)

デキストラン硫酸の反応時間を 2 時間から 12 時間にかえたほかは実施例 1 と同様にしてデキストラン硫酸およびアニリン固定化セルロースビーズ (D) を得た。この D のアニリン固定化量は 2.04 $\mu\text{mol/l}$ 、デキストラン硫酸固定化量は 0.68 $\mu\text{mol/l}$ 、AN/PA 比は 3.0 であった。

この D の吸着性能を実施例 1 と同様にして求めた。その結果、LDL-コレステロールが 79 mg/dl から 18 mg/dl に、フィブリノーゲンが 165 mg/dl から 112 mg/dl に低下したが、HDL-コレステロールは 101 mg/dl から 89 mg/dl へ、アルブミンは 4.5 g/dl から 4.0 g/dl へ低下するに留まった。

【0045】

(比較例 1)

デキストラン硫酸の反応時間を 2 時間から 24 時間にかえたほかは実施例 1 と同様にしてデキストラン硫酸およびアニリン固定化セルロースビーズ (E) を得た。この E のアニリン固定化量は 1.44 $\mu\text{mol/l}$ 、デキストラン硫酸固定化量は 0.75 $\mu\text{mol/l}$ 、AN/PA 比は 1.9 であった。

このEの吸着性能を実施例1と同様にして求めた。その結果、その結果、LDL-コレステロールが79 mg/dlから25 mg/dlに、フィブリノーゲンが165 mg/dlから130 mg/dlに、HDL-コレステロールは101 mg/dlから89 mg/dlに、アルブミンは4.5 g/dlから3.9 g/dlへ低下した。

【0046】

(比較例2)

実施例1と同様にして得たエポキシ化セルロースビーズ450 mlに、デキストラン硫酸210 gを300 mlの水に溶解したデキストラン硫酸水溶液、および水40 mlを加え、NaOH水溶液でアルカリ性とした後、45℃で8時間反応させた。反応後、ビーズを水および食塩水で十分洗浄し、デキストラン硫酸固定化セルロースビーズ(F)を得た。このFのデキストラン硫酸固定化量は0.60 μmol/ml、AN/PA比は0であった。

10

このFの吸着性能を実施例1と同様にして求めた。その結果、LDL-コレステロールが79 mg/dlから20 mg/dlに、フィブリノーゲンが165 mg/dlから147 mg/dlに、HDL-コレステロールは101 mg/dlから89 mg/dlへ、アルブミンは4.5 g/dlから4.2 g/dlに低下した。

【0047】

(比較例3)

実施例1と同様にして得たエポキシ化セルロースビーズ50 mlに、アニリン0.27 mlおよび水75 mlを加え、65℃で6時間静置した。その後、ビーズを水で十分洗浄してアニリン固定化セルロースビーズ(G)を得た。このGのアニリン固定化量は3.06 μmol/mlであった。

20

このGの吸着性能を実施例1と同様にして求めた。その結果、LDL-コレステロールが79 mg/dlから26 mg/dlに、フィブリノーゲンが165 mg/dlから106 mg/dlに、HDL-コレステロールは101 mg/dlから88 mg/dlへ、アルブミンは4.5 g/dlから4.2 g/dlに低下した。

【0048】

(比較例4)

実施例1と同様にして得たエポキシ化セルロースビーズ50 mlに、特開平7-136256で開示されているリガンド化合物であるトリフトファン(半井化学薬品)0.61 gを50℃に加温した水20 mlに溶解し、2N NaOH水溶液でアルカリ性にし、これを60℃で6時間振した。反応後、水で洗浄し、トリフトファン固定化セルロースビーズ(H)を得た。

30

このHの吸着性能を実施例1と同様にして求めた。その結果、フィブリノーゲンが165 mg/dlから82 mg/dlに低下したが、LDL-コレステロールが79 mg/dlから44 mg/dlへの低下に留まった。またHDL-コレステロールは101 mg/dlから89 mg/dlに、アルブミンは4.5 g/dlから4.1 g/dlに低下した。

【0049】

なお、実施例1～4、ならびに比較例1～4の吸着性能を評価した結果を表1に示した。

【0050】

40

【表1】

実施例	吸着体 略称	平均粒径 [μm]	固定化した 化合物	アニリン 固定化量 [$\mu\text{mol/ml}$]	ポリアニオン性 化合物 固定化量 [$\mu\text{mol/ml}$]	AN/ PA比	LDL-C 低下率 [%]	フィブリ ノーゲン 低下率 [%]	HDL-C 低下率 [%]	アルブミ ン 低下率 [%]
実施例1	A	260	DS,AN	2.76	0.20	13.8	78	42	12	7
実施例2	B	260	DS,AN	2.46	0.40	6.2	78	42	11	7
実施例3	C	260	DS,AN	2.28	0.60	3.8	76	28	11	7
実施例4	D	260	DS,AN	2.04	0.68	3.0	77	32	12	11
比較例1	E	260	DS,AN	1.44	0.75	1.9	68	21	12	13
比較例2	F	260	DS	0	0.60	0	75	11	12	7
比較例3	G	260	AN	3.06	0	—	67	36	13	7
比較例4	H	260	L-トリプトファン	—	—	—	44	50	12	9

* DS:デキストラン硫酸

AN:アニリン

AN/PA比:アニリン固定化量とポリアニオン性化合物固定化量のモル比

(実施例5)

平均粒径約260 μm の多孔質セルロースビーズを平均粒径約440 μm の多孔質セルロースビーズ(球状蛋白質の排除限界分子量が 5×10^7)に、またデキストラン硫酸の反応時間を2時間から1時間にかえたほかは実施例1と同様にしてデキストラン硫酸およびアニリン固定化セルロースビーズ(I)を得た。このIのアニリン固定化量は5.20 $\mu\text{mol/ml}$ 、デキストラン硫酸固定化量は0.14 $\mu\text{mol/ml}$ 、AN/PA比は87.1であった。

このIの吸着性能を実施例1と同様にして求めた。その結果、LDL-Cコレステロールが69mg/dlから28mg/dlに、フィブリノーゲンが217mg/dlから168

10

20

30

40

50

m \varnothing /dlに低下したが、HDLーコレステロールは51m \varnothing /dlから47m \varnothing /dlへ、アルブミンは4.8 \varnothing /dlから4.5 \varnothing /dlへ低下するに留まった。

【0051】

(実施例6)

デキストラン硫酸の反応時間を1時間から2時間にかえたほかは実施例5と同様にしてデキストラン硫酸およびアニリン固定化セルロースビーズ(J)を得た。このJのアニリン固定化量は3.18 μ m \varnothing /ml、デキストラン硫酸固定化量は0.17 μ m \varnothing /ml、AN/PA比は18.7であった。

このJの吸着性能を実施例1と同様にして求めた。その結果、LDLーコレステロールが69m \varnothing /dlから22m \varnothing /dlに、フィブリノーゲンが217m \varnothing /dlから161m \varnothing /dlに低下したが、HDLーコレステロールは51m \varnothing /dlから47m \varnothing /dlへ、アルブミンは4.8 \varnothing /dlから4.5 \varnothing /dlへ低下するに留まった。

10

【0052】

(実施例7)

デキストラン硫酸の反応時間を1時間から4時間にかえたほかは実施例5と同様にしてデキストラン硫酸およびアニリン固定化セルロースビーズ(K)を得た。このKのアニリン固定化量は2.94 μ m \varnothing /ml、デキストラン硫酸固定化量は0.24 μ m \varnothing /ml、AN/PA比は12.8であった。

このKの吸着性能を実施例1と同様にして求めた。その結果、LDLーコレステロールが69m \varnothing /dlから24m \varnothing /dlに、フィブリノーゲンが217m \varnothing /dlから164m \varnothing /dlに低下したが、HDLーコレステロールは51m \varnothing /dlから46m \varnothing /dlへ、アルブミンは4.8 \varnothing /dlから4.5 \varnothing /dlへ低下するに留まった。

20

【0053】

(比較例5)

平均粒径約260 μ mの多孔質セルロースビーズを平均粒径約440 μ mの多孔質セルロースビーズに、またデキストラン硫酸の反応時間を8時間から4時間にかえたほかは比較例2と同様にしてデキストラン硫酸固定化セルロースビーズ(L)を得た。このLのデキストラン硫酸固定化量は0.24 μ m \varnothing /ml、AN/PA比は0であった。

このLの吸着性能を実施例1と同様にして求めた。その結果、LDLーコレステロールが69m \varnothing /dlから85m \varnothing /dlに低下したが、フィブリノーゲンが217m \varnothing /dlから201m \varnothing /dlに低下するに留まった。またHDLーコレステロールは51m \varnothing /dlから47m \varnothing /dlへ、アルブミンは4.8 \varnothing /dlから4.5 \varnothing /dlへ低下した。

30

【0054】

(比較例6)

デキストラン硫酸の反応時間を4時間から24時間にかえたほかは比較例5と同様にしてデキストラン硫酸固定化セルロースビーズ(M)を得た。このMのデキストラン硫酸固定化量は0.60 μ m \varnothing /ml、AN/PA比は0であった。

このMの吸着性能を実施例1と同様にして求めた。その結果、LDLーコレステロールが69m \varnothing /dlから33m \varnothing /dlに低下したが、フィブリノーゲンが217m \varnothing /dlから190m \varnothing /dlに低下するに留まった。またHDLーコレステロールは51m \varnothing /dlから47m \varnothing /dlへ、アルブミンは4.8 \varnothing /dlから4.5 \varnothing /dlへ低下した。

40

【0055】

(比較例7)

平均粒径約260 μ mの多孔質セルロースビーズを平均粒径約440 μ mの多孔質セルロースビーズにかえたほかは比較例3と同様にしてアニリン固定化セルロースビーズ(N)を得た。このNのアニリン固定化量は5.46 μ m \varnothing /mlであった。

このNの吸着性能を実施例1と同様にして求めた。その結果、LDLーコレステロールが69m \varnothing /dlから34m \varnothing /dlに、フィブリノーゲンが217m \varnothing /dlから176

50

mg/dlに低下するに留まった。またHDL-コレステロールは51mg/dlから46mg/dlへ、アルブミンは4.8g/dlから4.5g/dlへ低下した。

【0056】

なお、実施例5～7、ならびに比較例5～7の吸着性能を評価した結果を表2に示した。

【0057】

【表2】

吸着体 略称	平均粒径 [μm]	固定化した 化合物	アニリン 固定化量 [μmol/ml]	ポリアニオン性 化合物 固定化量 [μmol/ml]	AN/ PA比	LDL-C 低下率 [%]	アポリ ノーゲン 低下率 [%]	HDL-C 低下率 [%]	アルブミ ン 低下率 [%]
実施例5	440	DS,AN	5.20	0.14	37.1	67	25	8	6
実施例6	440	DS,AN	3.18	0.17	18.7	68	26	8	6
実施例7	440	DS,AN	2.94	0.24	12.3	65	24	10	6
比較例5	440	DS	0	0.24	0	49	7	8	6
比較例6	440	DS	0	0.60	0	52	12	8	6
比較例7	440	AN	5.46	0	—	51	19	10	6

* DS:デキストラン硫酸

AN:アニリン

AN/PA比:アニリン固定化量とポリアニオン性化合物固定化量のモル比

【0058】

【発明の効果】

本発明により、アルブミンやHDLなどの有用物質を極力損失せず、低密度リポ蛋白およ

10

20

30

40

50

びフィブリンノーゲンを効率よく吸着除去し、該濃度を低下させた体液を得ることができる。本発明は、動脈硬化症、特に閉塞性動脈硬化症の患者の血液から、低密度リボ蛋白およびフィブリンノーゲンの濃度を低下させる方法として有効である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明吸着器の 1 実施例の概略断面図を示す。

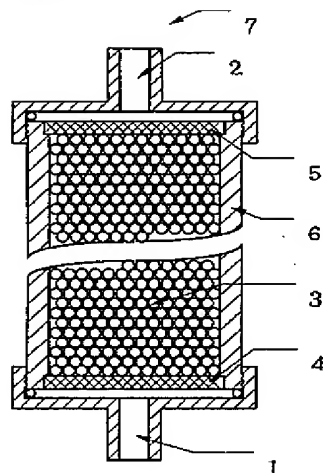
【符号の説明】

- 1 体液流入口
- 2 体液流出口
- 3 低密度リボ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着材
- 4、5 メッシュ（吸着材流出防止手段）
- 6 カラム
- 7 低密度リボ蛋白およびフィブリンノーゲンの吸着器

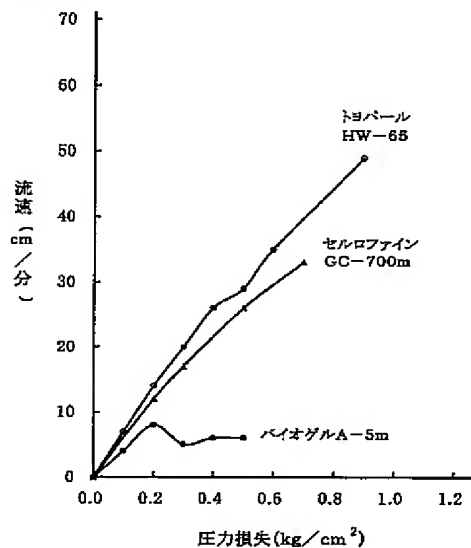
【図 2】3 種類のゲルを用いた場合の、流速と圧力損失との関係を示す。

10

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4G066 AB11B AC01B AC02C AC14B AC16B AC31B BA36 CA54 DA11 FA37